Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 14, No. 1, Apr. May. 2018, p. 187- 194

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد 14، شماره 1، فروردین-اردیبهشت 1397 ص. 194-187

شناسایی مولکولی وتجزیه وتحلیل بیوانفورماتیک وبررسی فیلوژنتیکی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* در نمونه‌های خمیر ترش صنعتی و سنتی

الهام اسحاق‌آبادی[1]- فرج‌الله شهریاری[2]- محمدرضا نصیری*[3]- محمد رضا عدالتیان دوم[4]- امین میرشمسی کاخگی[5]

تاریخ دریافت: 1394/07/25
تاریخ پذیرش: 1396/02/11

چکیده

باکتری‌های اسید لاکتیک (LAB) گروهی از باکتری‌های گرم مثبت، بدون اسپور هستندکه عموما به‌عنوان ارگانیسم‌های ایمن در نظر گرفته می‌شوند.از آنجایی که این باکتری‌ها توانایی تولید تغییرات مطلوب را در طعم و بافت غذا دارا هستند و بنا به اهمیت لاکتوباسیل‌ها در سلامت انسان، شناسایی مولکولی و بررسی فیلو ژنتیکی لاکتوباسیل‌های جداشده از خمیرترش نمونه محلی تربت جام و المان بر اساس توالی16s RNA مهمترین هدف این مطالعه است.بدین منظور خمیرترش بر اساس خصوصیات ارگانولپتیکی (عطر و طعم) از شهرستان تربت جام جمع‌آوری گردید.نمونه DNA از خمیرترش آلمان به‌طور مستقیم استخراج گردید. پس از استخراج DNA تکثیر قطعه253جفت بازی از ژن 16s RNA ریبوزومی توسط آغازگرهای اختصاصی انجام گرفت. سپس قطعات تکثیر شده تعیین توالی شدند. نتایج به‌دست آمده نشان داد که در موقعیت 182 و 205 به‌ترتیب تغییرات نوکلئوتیدی A/C و T/C وجود دارد که در موقعیت 182 اسیدآمینه هیستیدین به پرولین و در موقعیت 208 اسید گلوتامین به کدون پایان تغییر داده شد همچنین توالی نهایی بدست آمده از نمونه تربت با طول 253 جفت باز شامل24/1 درصد آدنین، 22/1 درصد گوانین، 27/3 درصد سیتوزین و 26/5درصد تیمین بود. نتایج فیلوژنتیکی با استفاده از روش Neighbor-Joining نشان داد، که باکتری *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* جدا شده ازخمیرترش نمونه محلی تربت جام کمترین فاصله ژنتیکی با آلمان، چین و هلند و بیشترین فاصله ژنتیکی با *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* فرانسه دارد.

واژهای کلیدی: اسید لاکتیک،خمیر ترش،ژن 16Sr RNA، تعیین توالی

مقدمه

نان به‌عنوان یکی از ارکان اصلی تأمین احتیاجات غذایی انسان در طول تاریخ از اهمیت ویژه‌ای برخوردار بوده است. نقش نان در تغذیه، تأمین انرژی است (Clarke & Arendt, 2005). در چند سال اخیر مصرف نان به دلایل متعدداز جمله بالا رفتن هزینه سایر مواد غذایی افزایش قابل ملاحظه‌ای یافته است. اهمیت به کیفیت نان، اهمیت به کیفیت حیات است و همچنین با توجه به اهمیت تغذیه‌ای و بهداشتی نان، اولین قدم در تولید نان سالم، انتخاب مواد اولیه مناسب و مطلوب، تهیه فرمول مناسب و روش عمل‌آوری صحیح خمیر می‌باشد. همواره تولید صنعتی نان با زمان ماندگاری مناسب، ویژگی‌های حسی مطلوب و عاری از افزودنی‌های شیمیایی، از دغدغه‌های صاحبان صنایع نانوایی، متولیان امر نظارت بر تولید و همچنین مصرف‌کنندگان نان بوده است. از بین روش‌های متعدد مانند افزودن آنزیم‌های سنتزی، صمغ‌ها، امولسیفایرها و بهبوددهنده‌های مختلفی که امروزه در دنیا بدین منظور مورد استفاده قرار می‌گیرند، استفاده از خمیرترش که ضمن افزایش زمان ماندگاری نان، سبب بهبود ویژگی‌های حسی و ارزش تغذیه ای آن نیز می‌شود، جایگاه ویژه‌ای دارد(Katina *et al.*, 2006). براساس جدیدترین تعاریف، خمیرترش یک سیستم بیولوژیکی بسیار پیچیده است و اساس تشکیل آن هم‌زیستی بین فلور میکروبی آرد و کشت‌های تجاری لاکتوباسیل می‌باشد که به‌عنوان آغازگر اختصاصی و به دلایل خاص مانند بهبود عطر و طعم، زمان ماندگاری، ارزش تغذیه‌ای و یا حتی ایجاد خواص سلامتی بخش در فرایند تخمیر نان مورد استفاده قرارمی‌گیرند (Katina *et al.*, 2006). نقش اصلی خمیرترش به دلیل دارا بودن باکتری‌های اسید لاکتیک به‌عنوان یک تکنولوژی، برای تخمیر و ورآمدن خمیر مطرح بوده است (Rizzello *et al.*, 2014). تخمیر اولیه خمیر احتمالا توسط مخلوطی از مخمرها و باکتری‌های اسید

1، 2و 5- به‌ترتیب دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، استاد و استادیار، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد.
3- استاد، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد.
4- استادیار، گروم علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد.
(* - نویسنده مسئول: Email: nassiryr@um.ac.ir)
DOI: 10.22067/ifstrj.v1396i0.50581

لاکتیک طبیعی موجود در خمیرترش صورت می‌گیرد. نوسانات پارامترهای فرایند شامل دما، بازده خمیر و مقدار و ترکیب کشت آغازگر کیفیت خمیرترش را تعیین می‌کنند (Di Cagno *et al*., 2002). علت اصلی استفاده از خمیرترش در نان گندم بهبود طعم است (Rizzello*et al*., 2014).

باکتری‌های اسید لاکتیک دارای توانایی پروتئولیتیک و آمیلولیتیک نیز هستند که به میزان زیادی در تأخیر بیاتی نان نیز نقش دارند (Katina *et al*., 2006). استفاده از آزمون‌های استاندارد میکروبیولوژیکی برای شناسایی لاکتوباسیل‌های خانواده باکتری‌های اسید لاکتیک، ممکن است با مشکلاتی همراه باشد. برای مثال شناسایی گونه‌های نزدیک به هم*لاکتوباسیلوس دلبروکی* زیر گونه بولگاریکوس، زیر گونه دلبروکی و زیر گونه لاکتیس، *لاکتوباسیلوس رامنوسوس*، *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*، *لاکتوباسیلوس کازئی* و *لاکتوباسیلوس پاراکازئی* بر اساس خواص فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی کار دشواری است، زیرا این باکتری‌ها در بسیاری از ویژگی‌ها مشترک هستند که در این بین توالی‌یابی نواحی از ژنوم این باکتری‌ها در شناسایی مولکولی باکتری‌های ازمایشگاهی از اهمیت خاصی برخوردار است (Corsetti *et al*., 1996). لذا در این سالهای اخیر برای شناسایی دقیق گونه‌ها، روش‌های مختلف PCR و توالی‌یابی ژن استفاده شده است (Giraffa &Neviani, 2001). از این‌رو، در این پژوهش، قطعه 253 جفت بازی از ژن 16S rRNA *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* به روش PCR تکثیر ونسبت به توالی یابی انها اقدام گردید. همچنین مقایسه توالی نوکلئوتیدی این ناحیه از *لاکتوباسیل پلانتاروم* سنتی باتوالی نوکلئوتیدی استارتر صنعتی (آلمان) و توالی‌های موجود در بانک جهانی ژن مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

براساس خصوصیات حسی (عطر ،طعم) نمونه‌های خمیر ترش از شهرستان تربت‌جام جمع‌آوری ونمونه استارتر صنعتی (خمیر ترش) از شرکت بوکرآلمان تهیه گردید (با رعایت شرایط استاندارد). نمونه‌ها تا زمان انتقال به آزمایشگاه و بررسی‌های میکروبی در دمای 4 تا 6 درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

به‌منظور جداسازی سویه‌های میکروبی، ابتدا 10 گرم از نمونه خمیرترش به 90 میلی‌لیتر از اب پپتون 0/1% منتقل(مرک ،المان) و پس از همو‌ژنیزه کردن (مدل Seward,UK)کشت سطحی از رقت‌های مختلف بر روی محیط کشت MRS-Agar در دو تکرار برای ایزولاسیون لاکتوباسیل‌ها انجام شد. به این ترتیب که روی هر پلیت 100 میکرو لیتر از هر رقت ریخته و پخش شد. به‌منظور رشد باکتری‌های مزوفیل وترموفیل، محیطهای کشت تلقیح شده به داخل جار بی‌هوازی مرک به‌همراه گاز پک مدل A در دو دمای 30و 45 درجه سانتی‌گراد و با مدت زمان 24تا 48 و حداکثر 72 ساعت بسته به نوع باکتری انتقال داده شدند.

از پلیت‌های دارای بالاترین رقت،کلنی‌هایی که از نظر شکل ظاهری، حاشیه کلنی ،رنگ و سایر ویژگی‌های مورفولوژیکی متفاوت بودند، انتخاب شده و سپس هرکدام در پلیت جداگانه کشت خطی داده شدند و پس از چندبار کشت خطی به‌منظور خالص‌سازی بیشتر کلنی‌های خطی از هر جدایه به‌دست امد. کلونی‌های خالص در هر پلیت از نظر رنگ‌آمیزی گرم و آزمون کاتالاز مورد بررسی قرار گرفت و ریخت سلولی با کمک میکروسکوپ نوری مشاهده گردید. جدایه‌های گرم مثبت و کاتالاز منفی جداشده برای بررسی‌های بعدی در محیط MRS مایع حاوی 20 % گلیسرول به‌صورت منجمد نگهداری شد (Sengun *et al*., 2009).

استخراجDNA

به‌منظور ایجاد سوسپانسیون میکروبی، هر جدایه در محیط کشت آبگوشت MRS به مدت یک شبانه‌روز در دمای30 درجه سانتی‌گراد کشت داده شد. DNA جدایه‌های میکروبی با استفاده از کیت استخراج DNA (امریکا،K721, Thermo) با اندکی تغییرات در دستورالعمل کیت استخراج شد. کمیت و کیفیت DNA استخراجی با استفاده از الکتروفورز روی ژل آگارز 1درصد و دستگاه نانودراپ اسپکتوفوتومتر (آمریکا، Thermo ND-2000) تعیین گردید.

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

به‌منظورتکثیر قطعه‌ای 253 نوکلئوتیدی ژن16SrRNA باکتری *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*، یک جفت آغازگر اختصاصی با توالی رفت 5′ AATTGAGGCAGCTGGCCA 3′ و پرایمر برگشت 5′ GATTACGGGAGTCCAAGC 3′با استفاده از نرم‌افزار Primer Premier 5 طراحی شدند. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز توسط دستگاه ترموسایکلر Biometra (آلمان، T-personal) و در36 چرخه حرارتی انجام پذیرفت (Hellemans&Vandesompele, 2011). واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با 100 نانوگرم DNA ژنومی، یک واحدآنزیم *Taq* پلی‌مراز، 2 میکرولیتر dNTPs 10میلی‌مولار، 2 میکرولیتر $MgCl_2$50 میلی‌مولار، 1 میکرولیتر مخلوط آغازگرهای رفت و برگشت 5 پیکومولار، 2/5 میکرولیتربافر 10X و آب دو بار تقطیر تا رسیدن به حجم نهایی 25 میکرولیتر انجام شد. برنامه حرارتی شامل واسرشت‌سازی دردمای 94 ºC به مدت 30 ثانیه، اتصال در دمای 50ºC به مدت30 ثانیه وتکثیردر دمای 72 ºC به‌مدت 60ثانیه؛ و یک مرحله واسرشت‌سازی اولیه دردمای 94 ºC به‌مدت 6 دقیقه و یک مرحله تکثیر نهایی در دمای 72ºC بود. الکتروفروز محصولات PCR انجام شد و پس از تایید اندازه قطعه

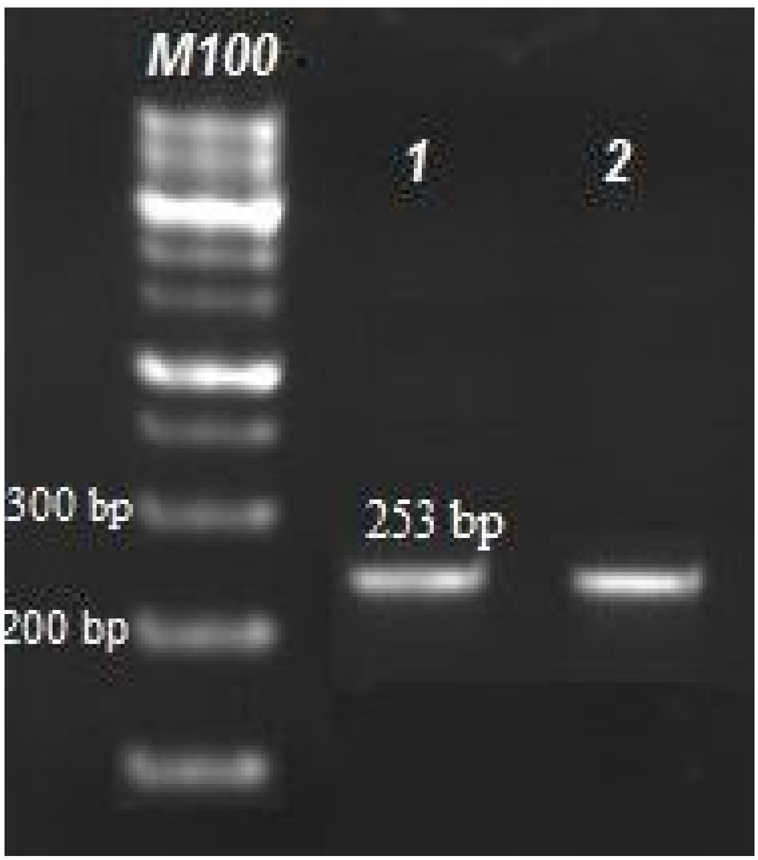
مورد نظر جهت توالی‌یابی به شرکت ماکروژن کره جنوبی ارسال گردید (شکل 1).

آنالیز بیوانفورماتیکی

آنالیز نتایج توالی‌یابی بااستفاده از نرم‌افزارهای بیوانفورماتیکی MEGA 5 ،Chromas Lite 2.01 ،CLC Main workbench 5.5 و Bio Edit انجام گرفت. ابتداتوالی‌های نوکلئوتیدی به‌دست آمده بااستفاده از نرم‌افزار Chromas Lite 2.01 ویرایش شدند، پس از تبدیل توالی‌ها به فرمت FASTA، از ابزار BLASTN در پایگاه NCBI و نرم‌افزار CLC Main workbench 5.5 جهت تعیین شباهت توالی بدست آمده با توالی‌های ثبت شده از همین ژن در بانک ژن NCBI استفاده شد. رسم درخت فیلوژنتیکی بین گونه‌های مختلف با استفاده از روش Neighbor-Joining (با 1000 تکرار) نرم‌افزار MEGA 5 انجام شد.جهت تعیین فاصله ژنتیکی از روش Create Pairwise Comparison نرم‌افزار CLC Main workbench 5.5 استفاده شد.

نتایج و بحث

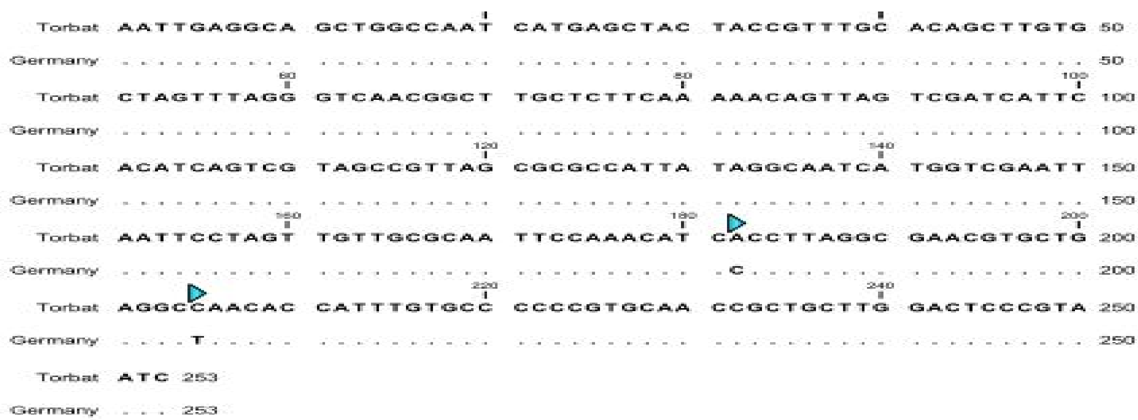
نتایج طیف‌سنجی و الکتروفورز ژل اگارز نشان دادکه DNA استخراج شده از کمیت و کیفیت مناسبی برای واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز برخوردار است. الکتروفورز محصولات PCR صحت تکثیر قطعه مورد نظر را توسط اغازگرهای 16SrRNA با طول 253bp تایید می‌کند (شکل1). سانگ و همکاران(2000) با طراحی پرایمرهای چندگانه توانستند ژن 16SrRNA به طول 350 جفت باز را تکثیر کنند. این محققان حضور باکتری *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* را در روده انسان تایید کردند. تورینی و همکاران(2001)، با استفاده از ژن RecA باکتری *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* را شناسایی کردند.



شکل 1- الکتروفورز محصولات PCR ژن 16SrRNA باطول 253bp بر روی ژل آگارز 1/5 درصد

مقایسه توالی‌های نوکلئوتیدی تربت و آلمان نشان داد که در دو جایگاه جهش جانشینی یکی حاصل تبدیل نوکلئوتید پورینی به پیریمیدینی (A/C) و دیگری حاصل تبدیل نوکلئوتید پیریمیدینی به پیریمیدینی (T/C) است که این تغییرات به‌ترتیب سبب تغییر

اسیدآمینه هیستیدین بـه پـرولین و گلوتـامین بـه کـدون خاتمـه در چهارچوب توالی اسـیدآمینه‌ای ژن 16SrRNAشـده انـد (شـکل 2). محتـوی نوکلئوتیـدی تـوالی ژن 16SrRNA در *لاکتوباسـیلوس پلانتاروم* جدا شده از خمیرترش تربت‌جام و آلمان نشان داد که در هر دو توالی حاوی G+C 49/4 درصد و A+T 50/6 درصد می‌باشند.



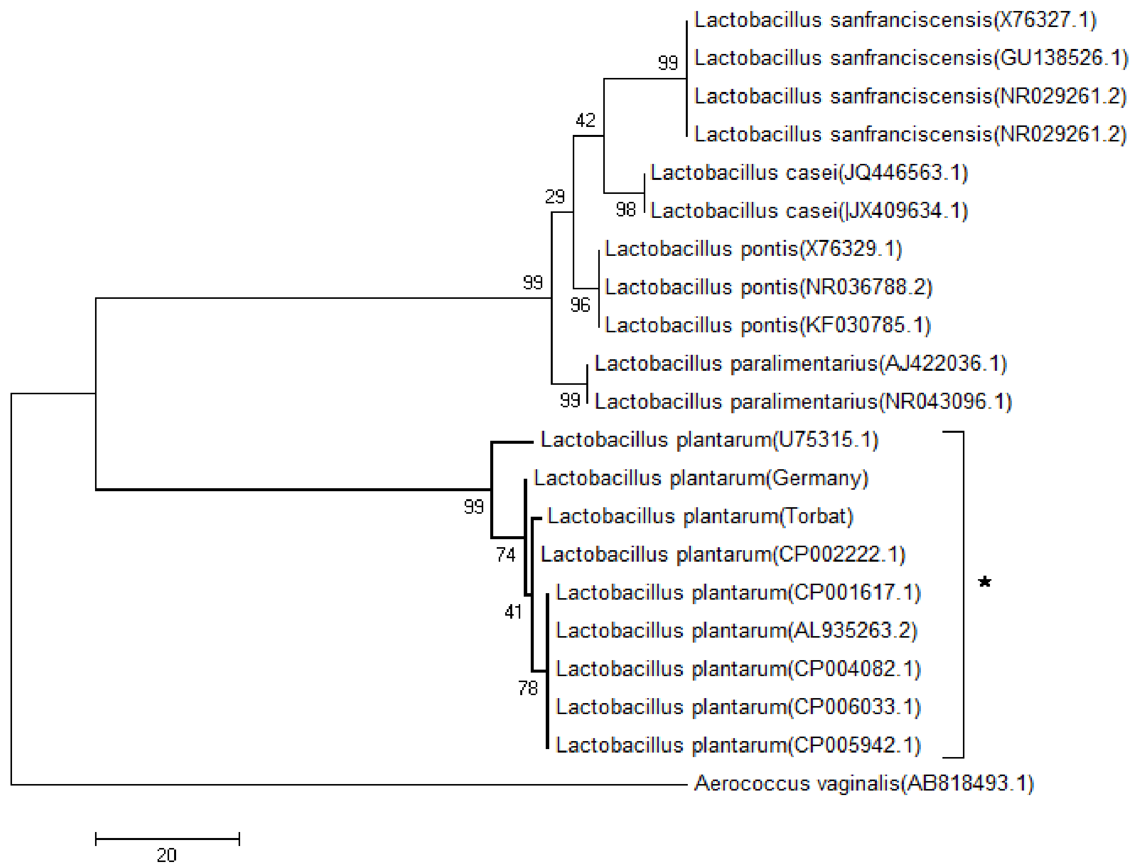
شکل 2- مقایسه تفاوت وشباهت توالی نوکلئوتیدی قطعه 253 جفت بازی ژن 16S rRNA *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* جدا شده از نمونه‌های خمیر ترش (تربت جام) سنتی و صنعتی(آلمان)

انالیز فیلوژنتیکی ومحاسبه فواصل فواصـل ژنتیکـی تـوالی‌هـای 16srRNA *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* در نمونه‌های تربت‌جام و آلمان با سایر توالی‌های لاکتوباسیل‌های موجـود در خمیرتـرش موجـود در پایگاه NCBI با استفاده از نرم‌افزار CLC Main workbench 5.5 انجام شد(جدول 1). با توجه به اینکه فاصله ژنتیکـی بـا همبسـتگی فیلوژنتیکی مرتبط است در نتیجه از این شاخص هم می‌تـوان بـرای تعیین دوری ونزدیکی ژنتیکی موجودات مختلف استفاده کرد. با توجه به جدول شماره 1 می‌توان نتیجه گرفت کـه *لاکتوباسـیل پلانتـاروم* نمونه‌های خمیرتـرش آلمـان، چـین و هلنـد و کمتـرین شـباهت بـا لاکتوباسیل خمیرترش فرانسه می‌باشد. این نتایج با نتایج تـورینی و همکاران (2011) مطابقت دارد. آنها گزارش کردند که بـاکتری‌هـای *لاکتوباسیل پلانتاروم* کشورهای اروپایی (آلمان، بلژیک، ایتالیا) در یک شاخه قرار می‌گیرند.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9
Torbat	1		0.01	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.07
Germany	2	99.21		0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.06
CP002222.1	3	98.42	98.42		0.01	0.01	0.01	0.01	0.02	0.08
CP006033.1	4	98.02	98.02	98.81		0.00	0.00	0.00	0.00	0.08
CP005942.1	5	98.02	98.02	98.81	100.00		0.00	0.00	0.00	0.08
CP004082.1	6	98.02	98.02	98.81	100.00	100.00		0.00	0.00	0.08
AL935263.2	7	98.02	98.02	98.81	100.00	100.00	100.00		0.00	0.08
CP001617.1	8	97.63	97.63	98.41	99.60	99.60	99.60	99.60		0.09
U75315.1	9	93.28	94.07	92.49	92.09	92.09	92.09	92.09	91.70	

جدول 1- ماتریس فواصل ژنتیکی و درصدتشابه که با نواحی قطعه 253 جفت بازی از ژن 16S rRNA *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* جدا شده از خمیرترش کشورهای مختلف بدست آمده است. مثلث بالایی، فواصل ژنتیکی ومثلث پایینی، درصدتشابه ژنتیکی را نشان می‌دهند.

به‌منظور تایید نتایج حاصل از ماتریس فواصل ژنتیکی، درخت فیلوژنتیک توالی‌های 16SrRNA با استفاده از نرم‌افزار MEGA 5 ترسیم شد (شکل2). درخت فیلوژنتیکی ترسیم شده نتایج به‌دست آمده از ماتریس فواصل ژنتیکی را تایید کرد. بطوریکه بر اساس آن *لاکتوباسیلوس پلانتاروم نمونه‌های* تربت جام و آلمان در یک زیر گروه قرار گرفتند. که این موضوع بیانگر قرابت ژنتیکی تقریباً نزدیک این دو لاکتوباسیلوس بود (وگل وهمکاران ،1994). نتایج بدست امده از این مطالعه با نتایج کیتاهارا و همکاران (2004) مطابقت داشت این محققین گزارش کردند که باکتری‌های *لاکتوباسیل پلانتاروم* کشورهای اروپایی (آلمان، بلژیک، ایتالیا) در یک شاخه قرار دارند. در نتیجه این قرابت ژنتیکی به اماده‌سازی خمیر در کشورهای مختلف بر می‌گردد. به‌منظور شناسایی باکتری‌های *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* ژن 16SrRNA در خمیرترش‌های کشور آلمان و بلژیک، تعیین توالی کردند و نتایج رسم درخت فیلوژنی نشان داد که *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* کمترین فاصله را با *لاکتوباسیل پوینتیس* و بیشترین فاصله را با *لاکتوباسیلوس سانفرانسیس* و *لاکتوباسیلوس سالیواریوس* داشت.



شکل 3- نمودار فیلو ژنتیکی توالی ژن 16sRNA *لاکتوباسیلوس پلانتاریوم* تربت و گونه‌های بررسی شده.

نمودار فیلو ژنتیکی توالی قطعه 253جفت بازی ژن 16s RNA جنس لاکتوباسیل‌ها را در خمیرترش تربت، آلمان و سایرلاکتوباسیل‌ها نشان می‌دهد.

نکته قابل توجه در شکل 3 قرار گرفتن جنس و گونه *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* در یک کلاد می‌باشد که نشان از دقت توالی‌یابی و اینکه توالی‌یابی قطعه 253جفت بازی از ژن 16S rRNA می‌تواند تفکیک بین گونه‌های مختلف را باعث گردد، می‌باشد .از طرف دیگر در داخل این کلاد نیز تفاوت‌های وجود دارد به‌طوریکه گونه پلانتاروم خمیرترش‌های چین، هلند، ایرلند، بلژیک، ایتالیا و همچنین پلانتاروم تربت جام (تحقیق حاضر) در یک مجموعه قرار می‌گیرند که نشان از شباهت پلانتاروم تربت‌جام با گونه‌های پلانتاروم اشاره شده می‌باشد از طرف دیگر پلانتاروم آلمان نیز در یک کلاد با پلانتاروم فرانسه قرار گرفته است. قابل ذکر است که پلانتاروم فرانسه نیز با کلیه پلانتاروم‌های مورد مطالعه در این پژوهش در یک کلاد قرار گرفته‌اند. کلادهای تفکیک شده برای گونه‌های سانفرانسیس، کازیی و پوینتیس نیز قابل مشاهده است.

نتیجه‌گیری

توالی‌یابی قطعه 253 جفت از ژن 16s RNA ریبوزومی *لاکتوباسیل پلانتاروم* تفاوت نوکلوئتیدی رادر موقعیت 205 و 182 نشان داد که خود نشان از تفاوت ژنتیکی این دو گونه می‌باشد این مشاهده، فرضیه وجود سویه‌های جدید و متفاوتی را ثابت می‌کند با این حال برای تعیین نوع سویه نیاز به مطالعاتی بیشتری می‌باشد. نتایج مطالعه حاضر نشان داد میان *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* موجود در نمونه‌های خمیر ترش تربت‌جام و آلمان شباهت 99/21 درصدی وجود داشت. در عین حال با توجه به اینکه هر دو این باکتری‌ها در یک جنس و گونه هستند لذا این درصد قابل پیش‌بینی بود. رسم درخت فیلو ژنتیک نیز نمونه *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* خمیرترش محلی تربت جام وآلمان را در یک گروه خوشه قرار داد (شکل 3). با این وجود *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* با لاکتوباسیلوس نمونه‌های فرانسه در یک کلاد قرار گرفت به‌طورکلی نتایج این مطالعه به‌خوبی نشان داد در باکتری *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* برای مناطق تربت‌جام وآلمان تنوع ژنتیکی وجود دارد.

تشکر و قدردانی

این مقاله مستخرج شده از پروژه پژوهشی به‌شماره 100884 مصوب معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه فردوسی مشهد می‌باشد. لذا، بدین وسیله از آن معاونت محترم تقدیر و تشکر می‌گردد. تصویب این پروژه از محل حمایت های مالی شرکت صنایع پخت مشهد می باشد که مراتب تشکر و قدردانی را از آن شرکت محترم داریم. پروژه در آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی انجام گرفته و بدین ترتیب از مسئولان مربوطه نیز کمال تشکر را داریم.

منابع

ChavanR.S.,&Chavan S.R. 2011. Sourdough technology– a traditional way for wholesome foods: a review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 10: 170–183.

Clarke C.I., & Arendt E.K. 2005. A review of the application of sourdough technology to wheat breads. Advances in *Food and Nutrition Research*, 49: 137–156.

CorsettiA., Gobbetti M. &Smacchi E. 1996. Antibacterial activity of sourdough lactic acid bacteria: isolation of a bacteriocin like inhibitory substance from Lactobacillus sanfrancisco C57. *Food Microbiology*, 13: 447–456.

De VuystL.&Vancanneyt M. 2007.Biodiversity and identification of sourdough lactic acid bacteria. *Food Microbiology*, 24: 120–127.

Di Cagno R., De Angelis M., Lavermicocca P., De Vincenzi M., Giovannini C., Faccia M. & Gobbetti M. 2002. Proteolysis by sourdough lactic acid bacteria: effects on wheat flour protein fractions and gliadin peptides involved in human cereal intolerance.*Applied & Environmental Microbiology*, 68:623-33.

EhrmannM.A.& Vogel R.F. 2005. Molecular taxonomy and genetics of sourdough lactic acid bacteria. *Trends in Food Science & Technology*, 16: 31–42.

Giraffa G.&Neviani E. 2001. DNA-based, culture-independent strategies for evaluating microbial communities in food-associated ecosystems. *International Journal of Food Microbiology*, 67: 19–34.

GobbettiM. 1998. The sourdough microflora: Interactions of lactic acid bacteria and yeasts. *Trends in Food Science & Technology*, 9: 267–274.

HellemansJ. &Vandesompele J. 2011.Quantitative PCR data analysis - unlocking the secret to successful results. In: Kennedy S., and Oswald N. (Eds.), PCR troubleshooting and optimization, the essential guide. *Caister Academic Press, Norfolk*, pp. 139–149.

Katina K., Arendt E., Liukkonen K.H., Autio K., Flander L. &Poutanen K. 2005. Potential of sourdough for healthier cereal products. *Trends in Food Science & Technology*, 16: 104–112.

Rizzello C.G., Curiel J.A., Nionelli L., Vincentini O., Di Cagno R., Silano M., Gobbetti M. & Coda R. 2014. Use of fungal proteases and selected sourdough lactic acid bacteria for making wheat bread with an intermediate content of gluten.*Food Microbiology*, 37:59-68.

SadeghiA. &Mortazavi S.A. 2011. Investigating the sourdough effect on main biological hazards in traditional Iranian flat bread. *Proceedings of the 2nd International Congress of Food Hygiene*. Tehran, pp. 49.

Sengun I.Y., Nielsen D.S., Karapinar M. &Jakobsen M. 2009. Identification of lactic acid bacteria isolated from Tarhana, a traditional Turkish fermented food. *International Journal of Food Microbiology*, 135: 105-111

Singh S., Goswami P., Singh R.& Heller K.J. 2009. Application of molecular identification tools for Lactobacillus, with a focus on discrimination between closely related species: A review. LWT - *Food Science and Technology*, 42: 448–457.

Torriani S., Felis G.&Dellaglio F.2001. Differentiation of Lactobacillus plantarum, L. pentosus, and L. paraplantarum by recA Gene Sequence Analysis and Multiplex PCR Assay with recA Gene-Derived Primers. Appl. *Environ*.

Microbiol. 67(8):3450.

Vogel R.,Bocker G.,Stolz P.,EhrmannM.,Fanta D., Ludwig W., Pot P.,Kersters K., Schleifer K. &Walter P. 1994. *InternationajloUrnalo F SystematbiaccTeriologayp*,R . P. 223-229.

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 14, No. 1, Apr. May. 2018, p. 187- 194

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد 14، شماره 1، فروردین-اردیبهشت 1397 ص.194-187

Molecular identification, bioinformatics analysis and phylogenetic relationships of *Lactobacillus plantarum* in traditional and industrial sourdough

E. Eshagh Abadi[1], F. Shahriari Ahmadi[2], M. R. Nassiri*[3], M. R. Edalatian Dovom[4], A. Mirshamsi[5]

Received: 2015.10.17
Accepted: 2016.04.30

Introduction: Bread is considered as one of the most important commodity which has provided human nutritional needs for several centuries. In recent decades, bread consumption has witnessed tremendous increase due to rising of other foods expenses. Cereal and bread industries has been always concerned about bread production in an industrial scale along with suitable shelf life, acceptable organoleptic properties and free from any chemical additives and preservatives. Among different methods such as addition of synthetic enzymes, gums, emulsifiers and improvers, sour dough has gained special attention besides shelf life enhancement and improvement of sensorial and nutritional features. The main role of sour dough has been prominent for fermentation and gas production in dough as a result of inclusion of Lactic Acid Bacteria (LAB) as a technology. Fluctuation of process parameters including temperature, dough yield and starter culture composition determine the sour dough quality. The main reason of sour dough application in wheat bread is flavor enhancement. Culture-based microbiological examinations have accompanied with some difficulties in accurate and precise identification of Lactobacilli. So, in recent years, in order to identify precisely, different molecular and PCR assays and gene sequencing have been applied. Thus, in present study, fragment of 253bp from 16 S rRNA gene in Lactobacillus plantarum was amplified with the help of PCR and sequenced in the next step. Also, comparison of nucleotide sequence of this region of traditional Lb. plantarum with nucleotide sequence of industrial starter (Germany) and sequences deposited in Gene Bank was evaluated.

Material and Methods: Sampling: According to sensory properties, sour dough samples were collected from Torbat e jam city and industrial starter sample (sour dough) was prepared from Buker Company, Germany.

Isolation and bio chemical analysis: Ten- fold serial dilutions of samples were prepared and cultured on MRS agar. Gram positive, catalase negative isolates were considered as presumptive LAB.

Molecular Identification: DNA of isolates were extracted according to the procedure of DNA extraction kit (Thermo, K721, USA). In order to amplify the 253 bp fragment of 16S rRNA in Lb. plantarum, specific primers were designed using Primer Premier 5. PCR was performed in Biometra Thermocycler (T- personal, Germany) in 36 cycles. In the following step, PCR products were sent to Macrogen Company for sequencing.

Bioinformatics analysis: Analysis of sequencing results was conducted with the aid of bioinformatics soft wares including CLC Main work bench, Chromas Lite 2.01, MEGA 5 and BioEdit. Phylogenetic tree was designed among different isolates using Neighbor-Joining method (bootstrap=1000) in MEGA 5 software. For determination of genetic distance, Create Pairwise comparison method was used in CLC Main workbench.

Results and Discussion: Quality and quantity of extracted DNA samples were confirmed by Gel electrophoresis. PCR and electrophoresis of PCR products confirmed and proved the accuracy and validity of amplified 253 bp fragment with intended primers. Comparison of Torbat and Germany nucleotide sequences demonstrated that two replacement mutations have been occurred including (A/C) and (T/C) in positions 182 and 205, respectively. These changes resulted in replacement of Histidine by Proline, and Glutamine by stop codon.

1. Former of MSc. student of Crop Biotechnology and Breeding, Department of Crop Biotechnology and Breeding, Ferdowsi University of Mashhad, Iran.
2. Professor of Crop Biotechnology and Breeding, Department of Crop Biotechnology and Breeding, Ferdowsi University of Mashhad, Iran.
3. Professor of Animal Science, Department of Animal Science, Ferdowsi University of Mashhad, Iran
4. Assistant Professor of Food Science and Technology, Department of Food Science and Technology, Ferdowsi University of Mashhad, Iran.
5. Assistant Professor of Crop Biotechnology and Breeding, Department of Crop Biotechnology and Breeding, Ferdowsi University of Mashhad, Iran.
(*Corresponding Author Email: nassiryr@um.ac.ir)

Nucleotide content of 16S rRNA gene sequence in Lb. plantarum isolated from Torbat e Jam and Germany sour dough samples displayed both sequences contained 49.4% (G+C) and 50.6% (A+T). Phylogenetic results demonstrated that Lb. plantarum isolated from Torbat e Jam and Germany samples were classified in the same sub group. This implies the close phylogenetic relationship between these two lactobacilli. In order to identify Lb. plantarum, 16S rRNA gene was sequenced in sour dough samples of Germany and Belgium and phylogenetic tree showed that Lb. plantarum had the lowest genetic distance with Lb. pontis and highest one with Lb. sanfranciscensis and Lb. salivarius

Keywords: Lactic acid, Sourdough, 16S rRNA gene, Sequencing